

УДК 576.895.121 : 591.4

**СТРУКТУРА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА  
ВНУТРЕННЕЙ ОБОЛОЧКИ ЯИЦ  
TRICHOCEPHALOIDES MEGALOCERHALA  
(CESTODA, DILEPIDIDAE)**

**В. А. Кашин, Г. П. Краснощеков**

Изучено формирование «мембраны онкосферы» и эмбриофора — производных внутренней оболочки яиц *T. megalocerphala*. Рассматриваются вопросы происхождения покровов онкосфер циклофиллидей.

Зародышевые оболочки онкосфер циклофиллидей представляют собой многослойное образование. Согласно Рыбицкой (Rybicka, 1966, 1972), в них выделены три основные структуры: наружная мембрана и расположенные под ней наружная и внутренняя оболочки. Наружная мембрана, или капсула, продуцируется желточными клетками до поступления ооцита в матку. Две другие оболочки закладываются как синцитиальные пласты: наружная — из двух макромеров, а внутренняя — из трех мезомеров, отошедших от зародыша во время дробления (Rybicka, 1973a). В процессе эмбрионального развития наружная оболочка формирует «яйцевую скорлупу», отлагающуюся на капсуле, внутренняя оболочка — эмбриофор и «мембрану онкосферы».

Морфогенетической дифференцировке оболочек соответствует, по-видимому, их функциональная дифференцировка. Производные наружной оболочки обеспечивают приспособление к внешней среде: предохраняют эмбрионы от высыхания и воздействия бактериальных энзимов, обеспечивают флоатацию яиц в воде и т. п. Дериваты внутренней оболочки определяют специфичность системы паразит—хозяин при инвазии промежуточных хозяев. Так, показаны избирательная устойчивость эмбриофора к пищеварительным энзимам, определенная специфичность факторов активации эмбрионов, зависящая, в частности, от проницаемости «мембраны онкосферы» (Lethbridge, 1980). Поэтому в плане изучения адаптации яиц цестод к инвазии промежуточного хозяина сравнительное изучение производных внутренней оболочки представляет существенный интерес.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ**

Исследовали фрагменты стробил цестоды *Trichocephaloides megalocerphala* (Krabbe, 1869), содержащие яйца на разных стадиях развития. Кусочки проглоттид из разных отделов стробилы фиксировали в 6.5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере pH=7.4 и промывали в растворе сахарозы; рассекали на несколько частей величиной приблизительно 1.5×1.5. мм каждая и дополнительно фиксировали в течение 2ч в 2%-ном растворе OsO<sub>4</sub> на ацетат-вероналовом буфере по Колфилду. Материал обезвоживали и заливали в смесь эпон-аралдит.

Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме LKB III, окрашивали уранилацетатом и контрастировали свинцом по Рейнольдсу. Срезы изучали в электронном микроскопе Tesla BS-500 при ускоряющем напряжении 90 кв. На срезах отбирали яйца, находящиеся на стадии ранней, средней, поздней преонкосферы и зрелой онкосферы по классификации Рыбицкой (Rybicka, 1966).

Для каждой стадии изучено не менее 20 экз. яиц от трех стробил, две из которых получены при вскрытии чернозобика, одна — американского бекасовидного веретенника.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На стадии ранней преонкосферы внутренняя оболочка представляет собой цитоплазматический синцитий, располагающийся на базальной цитоплазматической мембране, отграничивающей ее от развивающегося эмбриона (рис. 1, 2; см. вкл.). Толщина оболочки составляет 3.0—4.0 мкм, в области локализации ядер она увеличивается до 6.5—7.0 мкм. Синцитий содержит три крупных ядра размером  $4.7 \times 7.1$  мкм. Кариоплазма рыхлая, мелкозернистая, гетерохроматин практически отсутствует. Ядрышко плотное, компактное, расположено несколько эксцентрично. Цитоплазма разрезанная, более плотная вблизи ядер. Она содержит небольшие скопления рибосом, короткие расширенные канальца гранулярной эндоплазматической сети, многочисленные митохондрии, располагающиеся преимущественно в наружной зоне синцитиального слоя. Комплекс Гольджи в виде светлых везикул локализуется околоядерно. Включения немногочисленные, представлены везикулами, в различной степени заполненными гранулярным материалом. Светлые везикулы распределены в цитоплазме достаточно равномерно, заполненные гранулами выявляются чаще у внутренней цитоплазматической мембраны. На внешней поверхности внутренней оболочки имеются выпячивания в виде длинных цитоплазматических отростков, располагающихся параллельно оболочке.

На завершающих этапах этой стадии происходит поляризация цитоплазмы, проявляющаяся в распределении митохондрий и включений (рис. 1, 2, 3). Митохондрии концентрируются у наружной цитоплазматической мембраны, везикулы, содержащие электронноплотные гранулы, — у внутренней. Между последними появляются фрагменты тубулярных структур. Комплекс Гольджи, многочисленные светлые везикулы сосредоточены вблизи полюсов ядер, здесь же чаще наблюдается и большая концентрация полисом. Неравномерность распределения митохондрий и заполненных гранулами везикул более очевидна в удаленных от ядер участках (рис. 1, 3). На более поздних стадиях развитие наружной и внутренней зон настолько различно, что целесообразно дать их раздельное описание.

На стадии средней преонкосферы внутренняя зона представлена компактным слоем, составляющим примерно треть толщины оболочки (рис. 1, 4). В наружных двух третях зоны матрикс более светлый; в них имеется развитая система канальцев, формирующаяся, по-видимому, путем слияния везикул с гранулярным содержимым, выявляющихся на предшествующей стадии. В наружной трети зоны в просвете канальцев имеются трубочки с толстыми неровными стенками. По границе наружной и внутренней зон обнаруживаются фрагменты формирующейся «мембраны онкосферы» в виде разделенных светлым промежуточком двух электронноплотных слоев с регулярной поперечной исчерченностью, предшественниками которых, по-видимому, являются вышеописанные трубочки. Прилежащая к базальной цитоплазматической мембране треть внутренней зоны имеет однородную структуру и представляет собой слой несколько более плотного матрикса. Местами этот базальный слой представляется полностью изолированным цитоплазматической мембраной и может быть принят за самостоятельный или даже за тегумент онкосферы, но в других участках прослеживается его несомненная связь с внутренней оболочкой.

На стадии поздней преонкосферы внутренняя зона полностью отделяется от наружной «мембраной онкосферы», имеющей организацию, сходную с описанной для яиц *Taenia taeniaformis* (Nieland, 1968). Структура «мембраны» существенно отличается от свойственной ее фрагментам на предшествующей стадии. С наружной поверхности она образована двойной цитоплазматической мембраной, отделенной от внутреннего электронноплотного слоя светлым промежуточком. С внутренней стороны к электронноплотному слою прилежит одиночная мембрана, ограничивающая наружный цитоплазматический слой. Эта мембрана, по-видимому, является цитоплазматической мембраной, наружный

Листок которой сливается с внутренним электронноплотным слоем. В электронноплотном слое «мембраны онкосферы» имеется поперечная исчерченность (рис. 2, 1, 4; см. вкл.).

В это же время внутренняя зона оболочки полностью разделяется цитоплазматической мембраной на два слоя. Базальный слой, обычно описываемый как поверхностный синцитий тегумента онкосферы — зародышевый тегумент, имеет более светлый матрикс с включениями в виде светлых везикул различной величины (рис. 2, 1). Наружная поверхность его образует выпячивания, погруженные в более плотный слой, располагающийся под «мембраной онкосферы». В последнем выявляются небольшие глыбки электронноплотного материала и везикулы с более светлым содержанием, по крайней мере часть которых представляет поперечные срезы выпячиваний базального слоя. На этой стадии происходит значительное утолщение подстилающей внутренней оболочки базальной пластинки. Существенных изменений элементов внутренней зоны при дальнейшей дифференцировке онкосферы не происходит.

Наружная зона на стадии преонкосферы занимает около двух третей толщины внутренней оболочки. Цитоплазма ее представляется лишенной матрикса — в белковой жидкости имеются небольшие скопления рибосом и многочисленные митохондрии (рис. 1, 4). Последние существенно различаются по величине и структуре. Наряду с типичными имеются митохондрии с редуцированными кристами и полностью лишенные их, представляющие собой тельца угловатой формы, заполненные зернистым матриксом с участками уплотнения последнего, формирующимся, по-видимому, в результате деструкции крист. Под наружной цитоплазматической мембраной на этой стадии появляется тонкий, толщиной около 60 нм, зернистый слой — эмбриофор. Он не распространяется в выпячивания внутренней оболочки, цитоплазма которых, таким образом, оказывается изолированной от остальной массы цитоплазмы наружной зоны.

На стадии поздней преонкосферы формирующийся эмбриофор значительно утолщается. Наружная поверхность его ровная, отличается повышенной электронной плотностью вследствие более компактного расположения материала (рис. 2, 1). Внутренняя поверхность эмбриофора неровная, рыхлая. К ней прилежит слой цитоплазмы с многочисленными митохондриями, скоплениями полисом и зернистого материала. На большем протяжении цитоплазматический слой отделен от «мембраны онкосферы» электронносветлым пространством. Вблизи ядер плотность цитоплазмы более высокая, здесь имеются полиморфные митохондрии, зоны Гольджи, различной величины везикулы и ламеллярные тельца (рис. 2, 2).

На стадии зрелой онкосферы зернистый материал эмбриофора замещается тонкофибриллярным, его толщина увеличивается до 3.0 мкм; наружная поверхность его выглядит гомогенной и отличается большей электронной плотностью. Эмбриофор погружен в цитоплазму наружной зоны внутренней оболочки, разделяя ее на два слоя. Под эмбриофором располагаются ядра, приобретающие вытянутую форму. Кариоплазма их становится значительно плотнее, в ней появляются многочисленные мелкие глыбки материала высокой электронной плотности. Плотность матрикса цитоплазмы также увеличивается. В цитоплазме, как и на предыдущих стадиях, сохраняется большое количество митохондрий, существенно различающихся по структуре и форме (рис. 2, 3).

Слой внешней по отношению к эмбриофору цитоплазмы на всех стадиях развития по структуре не отличается от внутреннего. Толщина его варьирует в широких пределах за счет выростов неправильной формы, которые, по-видимому, на стадии зрелой онкосферы принимаются за щетинки эмбриофора, выявляемые при светооптическом исследовании и описанные у яиц этого вида (Томиловская, 1979). Связь внешней по отношению к эмбриофору цитоплазмы с ее ядрасодержащим внутренним слоем отсутствует.

Внутренняя оболочка и ее производные на всех стадиях развития отделены от собственно онкосферы базальной пластинкой. Последняя у зрелых онкосфер пронизана выводными протоками желез онкосферы, слепо оканчивающимися в инвагинатах базального слоя внутренней зоны оболочки (рис. 2, 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что на ранних этапах эмбриогенеза внутренняя оболочка яиц циклофиллидей представляет собой синцитиальный слой, располагающийся на базальной пластинке, ограничивающей эмбрион. На стадии преонкосферы происходит ее разделение на две зоны — наружную и внутреннюю. Первоначально дифференциация проявляется в поляризации цитоплазмы, а в конце стадии средней преонкосферы эти зоны разграничиваются «мембраной онкосферы».

Формирование эмбриофора начинается с отложения зернистого материала по периферии внутренней оболочки. При этом часть цитоплазмы, преимущественно в составе цитоплазматических выростов, изолируется эмбриофором от глубже расположенных отделов. Эмбриофор образуется как сплошной внутрицитоплазматический слой; увеличение его толщины происходит за счет присоединения поступающего из цитоплазмы гранулярного материала к внутренней поверхности эмбриофора. Имеется определенное сходство образующего эмбриофор зернистого материала и матрикса митохондрий, что может указывать на участие последних в его образовании. В пользу такой возможности свидетельствует и гранулярный распад крист митохондрий. Однако это предположение предстоит подтвердить адекватными методиками, поскольку изменения митохондрий могут быть проявлением деструктивных процессов, обусловленных высокой интенсивностью их функциональной активности в период формирования эмбриофора. После завершения формирования эмбриофора происходит уплотнение матрикса кариоплазмы, а также цитоплазмы как снаружи, так и вовнутрь от эмбриофора, что является следствием снижения уровня функциональной активности этой зоны синцития.

В целом динамика структуры наружной зоны внутренней оболочки яиц *T. megaloccephala* существенно не отличается от описанной для других видов (Rybicka, 1972; Swiderski, 1972; Fairweather, Threadgold, 1981; Gabrion, 1981). Исключением является трансформация материала эмбриофора из гранулярного в тонкофибриллярный на заключительной стадии его формирования, что свидетельствует об изменении его механических и, возможно, биохимических свойств.

Имеющиеся в литературе данные об образовании «мембраны онкосферы» весьма неопределенны и трактуются как «деляминация» внутренней плазматической мембраны внутренней оболочки (Rybicka, 1972; Gabrion, 1981). По нашим наблюдениям, «мембрана онкосферы», как и эмбриофор, закладывается в цитоплазме внутренней оболочки, но в отличие от эмбриофора она полностью изолируется в дальнейшем как от внутренней, так и от наружной зон оболочки цитоплазматическими мембранами. Формирование «мембраны онкосферы» осуществляется поверхностными отделами внутренней зоны оболочки; функция наружной ее зоны в морфогенезе защитных оболочек сводится к продукции эмбриофора.

Внутренняя цитоплазматическая зона оболочки уже на стадии ранней преонкосферы формируется как зона с менее выраженной функциональной активностью: здесь более плотный матрикс цитоплазмы, отсутствуют митохондрии и элементы комплекса Гольджи. Путем слияния везикул, продуцируемых более наружными отделами, в ней формируется система канальцев, в которых происходит образование тубулярных структур — предшественников «мембраны онкосферы». Поперечная исчерченность фрагментов формирующейся «мембраны» обусловлена, по-видимому, отличием гранулярного материала на поверхности толстостенных трубочек и проявляется при тангенциальной ориентации срезов. По завершении формирования «мембраны онкосферы» система канальцев в подлежащей цитоплазме редуцируется и внутренняя цитоплазматическая зона оказывается разделенной на два самостоятельных слоя.

Сходный механизм разделения прилежащей к базальной пластине цитоплазмы на самостоятельные слои описан Рыбичкой (Rybicka, 1973b) для яиц *Hymenolepis diminuta*. Однако она описывает эту зону как зародышевый тегумент, образуемый двуядерными эпителиальными клетками и дифференцирующийся на три отдельных слоя. Согласно нашим наблюдениям, эти слои на ранних ста-

диях являются частью внутренней оболочки и их формирование не связано с эпителиальными клетками онкосферы. Никаких цитоплазматических связей не установлено между клетками онкосфер и расположенным на базальной пластинке синцитием. Пронизывающие базальную пластинку отростки железистых клеток оканчиваются слепо в инвагинатах синцития.

Эти данные согласуются с наблюдениями Габриона (Gabrion, 1981, 1982), считающего, что зародышевый эпителий в разных отделах имеет неодинаковый генез — в области крючков он формируется особым синцитием, а в остальных отделах — внутренней оболочкой, с последующим установлением цитоплазматических связей с клетками онкосфер, трансформируясь в погружной эпителий, элементы которого, таким образом, имеют разное происхождение. В данном сообщении мы не рассматриваем зону зародышевых крючков, имеющую и у изученного нами вида дополнительный синцитиальный слой, поверхностные отделы которого морфологически сходны с поверхностным тегументом ранних постэмбриональных стадий развития. Аналогичная структура, описываемая как «шапочка, покрывающая крючья», выявлена и у других циклофиллид (Swiderski, 1972, 1983).

Однако нет убедительных данных, что покровные ткани в действительности формируются путем слияния гетерогенных элементов, а не образуются de novo путем распространения синцития из области крючков на остальную поверхность онкосферы или продукцией поверхностного синцития, например пронизывающими базальную пластинку протоками железистых клеток, являющихся по существу модифицированными цитонами тегумента. Формирование тегумента de novo описано, в частности, у некоторых псевдофиллид при внедрении в промежуточного хозяина (Тимофеев, Куперман, 1967, 1968; Куперман, 1973). Неясно также, насколько характерен для цестод различный генез зародышевого эпителия в зоне локализации крючков и в остальных отделах онкосферы.

Обращает на себя внимание еще одна особенность дифференцировки внутренней зоны оболочки. Рыбicka (Rybicka, 1973b) описывает у онкосфер *H. diminuta* три слоя зародышевого эпителия. У онкосфер *T. megaloccephala* имеется два слоя. Это указывает на существование в организации наиболее глубоких отделов оболочек онкосфер видовых особенностей, возможно, имеющих отношение к внедрению в промежуточного хозяина и в какой-то степени определяющих специфичность паразита к хозяину.

Ключевым моментом к решению вопросов гистогенеза покровных тканей цестод и функциональной дифференциации внутренних слоев зародышевых оболочек является исследование динамики их структуры на начальных этапах инвазии промежуточного хозяина. К сожалению, такие данные пока отсутствуют из-за методических трудностей.

#### Л и т е р а т у р а

- Куперман Б. И. Ленточные черви рода *Triacanthophorus* — паразиты рыб. Л., Наука, 1973. 206 с.
- Тимофеев В. А., Куперман Б. И. Ультраструктура наружных слоев корацидия *Triacanthophorus nodulosus*. — Паразитология, 1967, т. 1, вып. 1, с. 124—130.
- Тимофеев В. А., Куперман Б. И. Ультратонкое строение кутикулы и субкутикулярного слоя процеркоида, плероцеркоида и взрослых особей *Triacanthophorus nodulosus*. — Паразитология, 1968, т. 2, вып. 1, с. 42—49.
- Томилевская Н. С. Цестоды семейства *Dilepididae* Fuhrman, 1907 от куликов Чаунской низменности (северо-запад Чукотки). — В кн.: Экология и морфология гельминтов позвоночных Чукотки. М., Наука, 1979, с. 4—28.
- Fairweather I., Threadgold L. T. *Hymenolepis nana*: the fine structure of the embryonic envelopes. — Parasitol., 1981, vol. 82, N 3, p. 429—443.
- Gabrion Cl. Recherches sur l'oncosphere des cestodes: origine et formation de la calotte recouvrant les crochets. — Z. Parasitenk., 1981, vol. 65, N 2, p. 191—205.
- Gabrion Cl. Origine du tegument definitif chez les cestodes cyclophyllides. — Bull. Soc. zool. France, 1982, vol. 107, N 4, p. 465—469.
- Lethbridge R. S. The biology of oncospheres of cyclophyllidean cestodes (Review article). — Helminth. Abstr., series A, 1980, vol. 49, N 2, p. 60—72.
- Nieland M. L. Electron microscope observations on the egg of *Taenia taeniaeformis*. — J. Parasitol., 1968, vol. 54, N 5, p. 957—969.
- Rybicka K. Embryogenesis in *Hymenolepis diminuta*. I. Morphogenesis. — Exp. Parasitol., 1966, vol. 19, p. 366—379.

- R y b i c k a K. Ultrastructure of embryonic envelopes and their differentiation in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). — J. Parasitol., 1972, vol. 58, N 5, p. 849—863.
- R y b i c k a K. Ultrastructure of macromeres in the cleavage of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). — Trans. Amer. Microsc. Soc., 1973a, vol. 92, p. 241—255.
- R y b i c k a K. Ultrastructure of embryonic syncytial epithelium in a cestode *Hymenolepis diminuta*. — Parasitol., 1973b, vol. 66, N 1, p. 9—18.
- S w i d e r s k i Z. La structure fine de l'oncosphere du cestode *Catenotaenia pusilla* (Goeze, 1782) (Cyclophyllidea, Catenotaeniidae). — La Cellule, 1972, vol. 69, p. 207—237.
- S w i d e r s k i Z. *Echinococcus granulosus*: hook-muscle systems and cellular organisation of infective oncospheres. — Int. J. Parasitol., 1983, vol. 13, N 3, p. 289—299.

Институт биологических проблем Севера  
ДВНЦ АН СССР

Поступила 12.07.1985

---

# STRUCTURE AND DIFFERENTIATION OF THE INNER EGG MEMBRANE OF TRICHOCEPHALOIDES MEGALOCEPHALA (CESTODA, DILEPIDIDAE)

V. A. Kashin, G. P. Krasnoshchekov

## S U M M A R Y

Electron microscope studies of the inner membrane of developing eggs of *T. megalocephala* were carried out.

At early developmental stages the inner membrane is a syncytial cytoplasmatic layer lying on the basal plate of the embryo. At the preoncosphere stage the division of the membrane into two zones (external and internal ones) takes place. Initially the differentiation manifests itself in the cytoplasm polarisation; at the end of the middle preoncosphere stage the zones are divided by the «oncosphere membrane». The formation of the «oncosphere membrane» is accomplished by the external part of the internal zone. Embryophore is a derivative of the external zone, at the final stages of the formation the embryophore material is transformed from granular into thin-fibrillary.

The origin of the external integument of oncospheres of cyclophyllids, which, as it has been shown for *T. megalocephala*, is a derivative of the inner membrane rather than of specialized epithelial oncosphere cells, is considered.

---



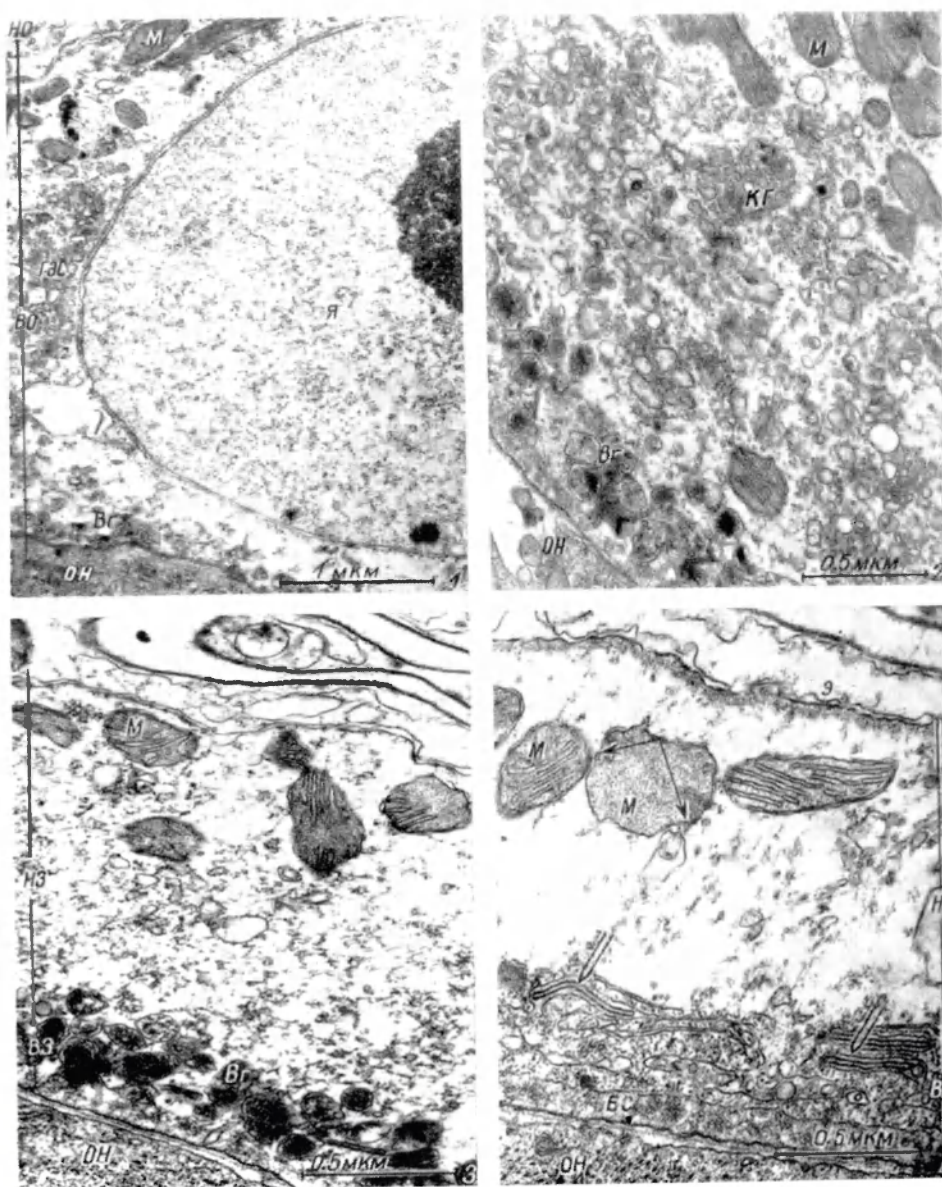


Рис. 1. Внутренняя оболочка на стадиях ранней и средней преонкосферы.

1 — фрагмент синцития внутренней оболочки на стадии ранней преонкосферы; 2 — перинуклеарная цитоплазма на стадии ранней преонкосферы; 3 — поляризация цитоплазмы внутренней оболочки в удаленных от ядер участках; 4 — средняя преонкосфера: митохондрии с гранулярным распадом крист (стрелка), толстостенные трубочки в просвете канальцев внутренней цитоплазматической зоны (двойная стрелка). БС — базальный слой внутренней зоны, Вг — везикулы с гранулярным содержимым, ВЗ — внутренняя зона внутренней оболочки, ВО — внутренняя оболочка, ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть, КГ — комплекс Гольджи, М — митохондрии, НЗ — наружная зона внутренней оболочки, НО — наружная оболочка, ОН — онкосфера, Э — эмбриофор, Я — ядро внутренней оболочки.

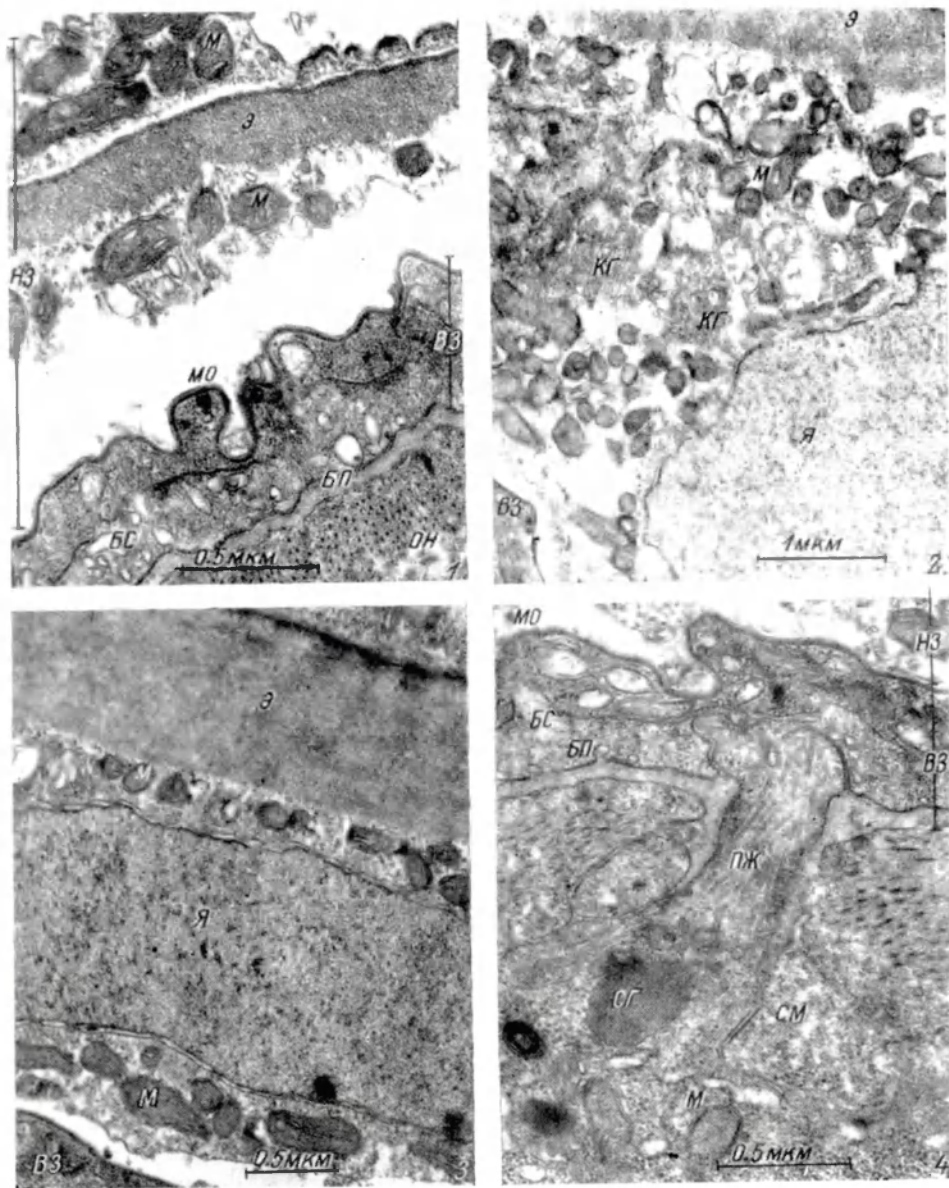


Рис. 2. Поздние стадии дифференцировки внутренней оболочки.

1 — поздняя преонкосфера: изоляция наружной и внутренней зон внутренней оболочки; 2 — перинуклеарная цитоплазма на стадии поздней преонкосферы; 3 — наружная зона на стадии зрелой онкосферы; 4 — зрелая онкосфера: протоки железистых клеток, оканчивающиеся в базальном слое внутренней оболочки. БП — базальная пластинка, МО — «мембрана онкосферы», ПЖ — протоки железистых клеток, СГ — секреторные гранулы, СМ — соматическая мускулатура онкосферы. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.